

①9 BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



①2

**Gebrauchsmuster****U1**

- (11) Rollennummer G 91 06 105.9
- (51) Hauptklasse A61K 49/00  
Nebenklasse(n) A61B 10/00
- (22) Anmeldetag 17.05.91
- (47) Eintragungstag 26.09.91
- (43) Bekanntmachung  
im Patentblatt 07.11.91
- (54) Bezeichnung des Gegenstandes  
Diagnose-Kit zum Nachweis von  
Human-Papillomavirusinfektionen
- (71) Name und Wohnsitz des Inhabers  
Behringwerke AG, 3550 Marburg, DE

Ein Hauttest auf Humanpapillomavirus Typ 16  
-----

Die Erfindung betrifft einen Hauttest auf Human-Papillomavirus (HPV) Typ 16.

Der HPV16 ist ein Typ des Human-Papillomavirus, der  
5 erstmals in Proc. Acad. Sci., USA 80, 3813-1815 (1983) beschrieben wurde.

Die DNA-Sequenz und die Genomorganisation von HPV16  
10 wurden in Virology 145, 181-185 (1985) veröffentlicht.

HPV16 ist nicht nur eng mit benignen Läsionen des  
Anogenital-Traktes verbunden, sondern auch mit malignen  
Karzinomen des Cervix uteri, des Penis und der Vulva.  
Außerdem kann HPV16 auch in Genitalabstrichen von kli-  
15 nisch asymptomatischen Personen gefunden werden. Über  
die Immunantwort auf Infektionen durch HPV16 und Pa-  
pilloma-Viren im allgemeinen ist wenig bekannt.

Einige seroaktive Epitope in den Proteinen E4, E6, E7  
20 und L1 von HPV wurden von Müller, M. (1990), J. Gen.  
Virol. 71, 2709-2717, dargelegt.

Zur Zeit stehen jedoch keine wirksamen Screening-Tests  
für aktive und latente Human-Papillomavirusinfektionen  
25 mit hohem Risiko zur Verfügung. Die klassischen Intra-  
kutan-Tests mit viralen Fusionsproteinen wurden für

diesen Zweck bislang noch nicht angewandt. Diese Tests könnten es ermöglichen, zellvermittelte Immunantworten (Schreier A.A. et al. Prospects for Human Papilloma-virus Vaccines and Immuntherapies. J. Natl. Cancer Inst. 5 1988, 80, 896-899) in vivo gegen Virusproteine festzustellen, und somit Einblicke in die Epidemiologie und den Verlauf von HPV-Infektionen geben.

10 Es wurde überraschenderweise gefunden, daß bei einem Hauttest positive Reaktionen auf Protein L1 von HPV 16, nicht jedoch auf Protein E4 von HPV16 beobachtet wurden.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher:

15

1. Diagnose-Kit zum Nachweis von Human-Papillomavirus-infektionen, das eine wirksame Menge des Proteins L1 des Human-Papillomavirus 16 oder immunologischer Teile desselben enthält.

20

2. Diagnose-Kit zum Nachweis von Human-Papillomavirus-infektionen bei Patienten mit cervikaler intraepithelialer Neoplasie, das eine wirksame Menge des Proteins L1 des Human-Papillomavirus 16 oder immunologischer Teile desselben enthält.

25

Um einen Diagnose-Kit zu entwickeln und einen spezifischen Hauttest durchzuführen, wurden die offenen Leseraster E4 und L1 von HPV16 (Seedorf et al. (1987), EMBO J., 6, 139-144), insbesondere der N-terminale Teil 30 L1/1/2 und der C-terminale Teil L1/23/2 kloniert und exprimiert, und die entsprechenden Proteine von E4, L1 oder Teile derselben wurden unter Anwendung allgemeiner Rekombinationstechniken, geeigneter Expressionsvektoren und einschlägig bekannter Reinigungsmethoden isoliert. 35 Auf die gleiche Weise wurden Kontrollproteine von der Wirtszelle gewonnen, die den Expressionsvektor ohne

91 06 105.

Virus-Insert enthielt. Das Testverfahren umfaßte im allgemeinen die intrakutane Injektion einer wirksamen Menge des Proteins L1 von HPV16 von etwa 9-25 µg, vorzugsweise etwa 9-15 µg, insbesondere etwa 10 µg von z.B. etwa 0,03-0,05 ml einer Proteinlösung (Proteingehalt etwa 300-500 µg/ml) und intrakutane Injektionen von Kontrollösungen.

Die Tests wurden vorzugsweise an Patientinnen mit cervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) ausgeführt. Positive Hauttests wurden fakultativ Biopsien und z.B. routinemäßigen histopathologischen, immunchemischen oder Immunfluoreszenz-Untersuchungen unterzogen. Obwohl Biopsien und serologische Assays zur Durchführung eines wirksamen und spezifischen Hauttests auf HPV16 nicht nötig sind, wurden zusätzlich Blutproben für serologische Assays verwendet.

Die Ergebnisse belegen die Wirksamkeit des Proteins L1 von HPV in einem empfindlichen und spezifischen Hauttest zum Screening auf CIN. Antikörper gegen E4 können dagegen nur bei 42,6% der Patientinnen mit CIN nachgewiesen werden (Jochmus-Kudielka, I. et al. "Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer." J. Natl. Cancer Inst. 1989, 81, 1698-1704).

Die Erfindung wird anhand des nachfolgenden Beispiels erläutert, das jedoch keine Einschränkung der Erfindung darstellt.

### Beispiel

- Die offenen Leseraster E4 und L1 von HPV16 (N-terminaler Teil = L1/1/2, C-terminaler Teil = L1/23/2) wurden in pEX-Vektoren kloniert, in E. coli C600/537 als MS2-Polymerase-Fusionsproteine exprimiert (Jochmus-
- 5 Kudielka, I., Gissmann, L. (1990): Expression of human papillomavirus type 16 proteins in Escherichia coli and their use as antigens in serological tests. In: Recombinant systems in protein expression. Alitalo, K.K., Hutala, M.L., Knowlers, J., Vaheri, A., eds.
- 10 Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V. 87-93), die Expressionsprodukte mit 7M-Harnstoff extrahiert und durch Gelextraktion gereinigt. Die Proteinlösungen (Proteingehalt etwa 300 µg/ml) wurden sterilisiert und in Aliquoten gelagert. Kontrollproteine wurden auf die
- 15 gleiche Weise aus Extrakten von Bakterien, die den pEX-Expressionsvektor ohne Virus-Insert enthielten, gewonnen. Nach der Einholung der Genehmigung des örtlichen Ethikkomitees wurden Hauttests an Freiwilligen durchgeführt.
- 20
- Das Testverfahren umfaßte die intrakutane Injektion von 0,03 ml jeder Proteinlösung zusammen mit Injektionen von Kontrolllösungen und Prüfung von sogenannten recall-Antigenen (Merieux-Multitest). Die Tests wurden durch-
- 25 geführt an:
- a) sieben Patientinnen mit cervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) von mindestens einjähriger Dauer und positiver Filterhybridisierung für HPV16/18 - eine
- 30 Patientin war auch bei Polymerase-Kettenreaktion (PCR) HPV16-positiv - doch negativ für 6/11/31/33/35 (ViraTypeR, GIBCO/BRL); und

- b) zehn Kontrollpersonen, die keine klinischen Zeichen für genitoanale Warzen aufwiesen und auch in der Krankengeschichte keine gehabt hatten (vier männliche Ärzte und sechs Frauen; letztere hatten keine cervi-  
5 kalen zytologischen Anomalien, für alle obengenannten HPV negative Hybridisierungstests und waren außerdem HPV16-negativ bei PCR).

Positive Hautteststellen wurden an den Tagen 2, 3, 7  
10 oder 8 Biopsien und routinemäßigen histopathologischen, immunchemischen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen unterzogen. Blutproben wurden den Freiwilligen unmittelbar vor den Injektionen entnommen und für serologische Assays verwendet.

15 Bei allen getesteten Personen lagen die Reaktionen auf den Merieux-Multitest im Normalbereich. Keine der Kontrollpersonen reagierte auf HPV16-Fusionsprotein. Fünf der sieben Patientinnen mit CIN zeigten dagegen  
20 deutlich positive Reaktionen auf L1/23/2 ( $p = 0,0034$ , Fisher exact test (Armitage, P., Statistical methods in medical research, Blackwell, Oxford 1971), zweiseitige Wahrscheinlichkeit). Drei dieser Patientinnen und eine weitere Patientin reagierten auf L1/1/2 ( $p = 0,0147$ ),  
25 und eine Patientin reagierte auf keines der Proteinfragmente. Es wurde keine Reaktivität auf E4 oder die Kontrollproteine festgestellt.

Bei fünf der neun positiven Reaktionen zeigte sich ein  
30 zweiphasiger Verlauf mit einer frühen sowie einer späten Reaktion. Die frühen Reaktionen (hautfarbige Quaddeln von bis zu 5 mm Durchmesser) traten 24 Stunden nach Injektion auf, erreichten nach einer Woche ihre maximale Größe und dauerten über 3 Wochen an. Bei einem Patienten  
35 wurde eine Titration von L1/1/2-Antigen durchgeführt und ergab erkennbare positive (späte) Reaktionen bis zu

einer Verdünnung von 1:100 der Proteinzubereitung (= 0,01 µg Fusionsprotein). Die Histopathologie der Biopsien der Frühreaktionen zeigte eine Arthus-artige Reaktion mit neutrophiler Vaskulitis und vaskulären  
5 IgM-und C3-Ablagerungen. Die Biopsien von Spätreaktionen zeigten dichte Lymphozyteninfiltrate, die der Tuberkulinreaktion ähnelten (Kuramoto, Y. & Tagami, H., Histopathologic pattern analysis of human intracutaneous  
10 tuberculin reaction. Am. J. Dermatopathol. 1989, 11, 329-337) und an das Infiltrat erinnerten, das bei sich spontan zurückbildenden Flachwarzen beobachtet wird (Iwatsuki, K. et al. Plane warts under spontaneous  
15 regression. Arch. Dermatol. 1986, 122, 655-659) (vorwiegend UCHL-1-positive Gedächtniszellen, praktisch keine natürlichen Killerzellen, einige verstreute Riesenzellen).

Fünf Kontrollpersonen hatten keine Anti-HPV16-E4-Antikörper; bei vier von sechs CIN-Patientinnen, ein-  
20 schließlich der mit negativem Hauttest, konnte dagegen Seroaktivität gegen das E4-Protein nachgewiesen werden.

**Ansprüche:**

1. Diagnose-Kit zum Nachweis von Human-Papillomavirus-  
infektionen, das eine wirksame Menge des Proteins L1  
des Human-Papillomavirus 16 oder immunologischer  
Teile desselben enthält.
- 5 2. Diagnose-Kit zum Nachweis von Human-Papillomavirus-  
infektionen bei Patienten mit cervikaler intraepi-  
thelialer Neoplasie, das eine wirksame Menge des  
Proteins L1 des Human-Papillomavirus 16 oder immuno-  
10 logischer Teile desselben enthält.